






**Monoclonal antibody against interleukin-6 receptor - for treating and preventing interleukin-6 related diseases, e.g. multiple myeloma, and for receptor assays****Publication number:** FR2694767 (A1)**Publication date:** 1994-02-18**Inventor(s):** JOHN WIJDENES; CLAUDE CLEMENT; DELPHINE MARCHAND**Applicant(s):** INNOTHERAPIE LAB SA [FR]**Classification:****- international:** **C07K16/28; C12N5/20; C12P21/08; A61K38/00; C07K16/18; C12N5/20; C12P21/08; A61K38/00; (IPC1-7): C12P21/08; A61K39/395; C12N5/20; G01N33/577****- European:** C07K16/28H**Application number:** FR19920010005 19920813**Priority number(s):** FR19920010005 19920813**Also published as:** FR2694767 (B1)**Cited documents:** EP0409607 (A2) EP0413908 (A2) DE3939706 (A) JP2138993 (A)**Abstract of FR 2694767 (A1)**

A monoclonal antibody (MA6) directed against interleukin-6 receptor (IL-6R) recognises an epitope which is the same as that recognised by one of the IgG1 monoclonal antibodies B-F19, B-R6 or B-N12 produced by hybridomas CNCM I-1256, 1255 and 1257 respectively. Also claimed are the hybridomas I-1256, 1255 and 1257, and a diagnostic reagent contg. the above Ab. Pref., these contain 0.5-5 (esp. 1) mg MAb/ml, MAb are pref. formulated with other MAbs to produce polymeric complexes between soluble IL-6R and the antibodies. Such complexes are eliminated more quickly than those formed from a single antibody. USE - MAb inhibit or suppress growth of IL-6 dependent cells so can be used to treat or prevent IL-6 associated diseases, specifically multiple myeloma; myeloid leukaemia; Castleman disease; systemic lupus erythematosus; kidney cancer and inflammatory arthropathy MAb can be coupled to a toxin, radioactive cpd. or other therapeutic agent. The MAb can also be used to detect or quantify (e.g. by ELISA) IL-6R, including its soluble forms and epitopes.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 694 767**

②① N° d'enregistrement national : **92 10005**

⑤① Int Cl<sup>5</sup> : C 12 P 21/08, A 61 K 39/395, G 01 N 33/577, C 12 N 5/20

①② **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②② Date de dépôt : 13.08.92.

③⑦ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : *INNOTHERAPIE LABORATOIRES*  
(S.A.) — FR.

⑦② Inventeur(s) : Wijdenes John, Clément Claude et  
Marchand Delphine.

④③ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 18.02.94 Bulletin 94/07.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : Cabinet Ores.

⑤④ Anticorps monoclonaux anti-IL6R, et leurs applications.

⑤⑦ L'invention est relative à des anticorps monoclonaux  
dirigés contre le récepteur IL-6R de l'interleukine-6 hu-  
maine, et à leur utilisation pour l'obtention de médicaments  
et de réactifs de diagnostic. L'invention englobe également  
les lignées d'hybridomes produisant lesdits anticorps.

**FR 2 694 767 - A1**



ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-IL6R, ET LEURS APPLICATIONS.

L'Invention est relative à de nouveaux anticorps monoclonaux qui reconnaissent le récepteur de  
5 l'interleukine-6 humaine (IL-6R) et qui peuvent inhiber l'interaction de l'IL-6 avec l'IL-6R.

L'Invention est en outre relative à l'utilisation desdits anticorps monoclonaux pour le diagnostic et pour l'obtention de médicaments.

10 L'interleukine-6, qui a également été appelée initialement facteur 2 de stimulation de cellules B humaines [KAWANO et al., Nature, 332, 83-85, (1988)], ou bien facteur de croissance des hybridomes [BAZIN et LEMIEUX, J. Immunology, 139, 78-87, (1987)], fait partie  
15 des médiateurs de l'immunité cellulaire.

L'IL-6 est connue pour avoir un large spectre de fonctions biologiques. Les effets de l'IL-6 sur les cellules T [GORMAN et al., PNAS, 84, 7629-7633, (1987)], les plasmacytomes [VAN DAMME et al., J. Exp. Med. 165,  
20 914-919, (1987)], les hépatocytes [ANDUS et al., FEBS Lett. 221, 18-22, (1987)] et les fibroblastes [KOHASE et al., Cell, 45, 659-666, (1986)], sont décrits dans la littérature, ainsi qu'un grand nombre d'exemples du rôle physiopathologique de l'IL-6, dont une revue a récemment  
25 été publiée par HIRANO [International J. Cell Cloning, 9, 166-184, (1991); et Clin. Immun. Immunopath., 62, n° 1, S60-S65, (1992)].

Le récepteur de l'IL-6 présent sur les membranes cellulaires, qui fixe spécifiquement l'IL-6 (gp80)  
30 a été décrit par TAGA et al. [J. Exp. Med., 166, 967-981, (1987)]. Une fois que l'IL-6 est fixée au récepteur IL-6R, la gp80 s'associe avec une molécule dénommée gp130, qui ne fixe pas elle-même l'interleukine-6, mais qui transmet un signal [TAGA et al., Cell, 58, 573-581,  
35 (1989)]. Le récepteur IL-6R sous forme soluble lié à l'IL-6 est également capable d'induire un signal transmis

par la gp130 membranaire. En conséquence, il apparaît que l'IL-6R joue un rôle important dans la physiopathologie de l'IL-6, et que ses antagonistes ont un rôle important à jouer dans le traitement de différentes maladies dans  
5 lesquelles l'IL-6 intervient.

En outre, dans un but de diagnostic, il est souhaitable de disposer de réactifs de diagnostic permettant de mesurer la concentration du récepteur IL-6R sous forme soluble.

10 La présente Invention s'est fixé pour but la préparation d'anticorps monoclonaux reconnaissant le récepteur IL-6R, et capables d'inhiber ou de supprimer la croissance des cellules IL-6 dépendantes, et/ou d'être utilisés en tant que réactifs de diagnostic.

15 Cet objectif a été atteint par les Inventeurs par l'isolation de nouvelles lignées cellulaires d'hybridomes produisant des anticorps monoclonaux anti-IL-6R.

La présente Invention a pour objet des anti-  
20 corps monoclonaux dirigés contre le récepteur IL-6R, lesquels anticorps sont caractérisés en ce qu'ils reconnaissent un épitope choisi dans le groupe constitué par:

- l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal d'isotype IgG1 dénommé B-F19, produit par la lignée  
25 d'hybridome déposée le 12 août 1992 auprès de la C.N.C.M. (COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES, tenue par l'INSTITUT PASTEUR, 28, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15 (FRANCE), sous le numéro de Dépôt I-1256 ;

30 - l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal d'isotype IgG1 dénommé B-R6, produit par la lignée d'hybridome déposée le 12 août 1992 auprès de la C.N.C.M., sous le numéro de Dépôt I-1255 ;

- l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal  
35 d'isotype IgG1 dénommé B-N12, produit par la lignée d'hybridome déposée le 12 août 1992 auprès de la

C.N.C.M., sous le numéro de Dépôt I-1257.

L'invention englobe en particulier des variants de commutation de classe des anticorps BF-19 B-R6 et B-N12, tels que par exemple des variants appartenant aux isotypes IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2a et autres sous-classes d'immunoglobulines ; de tels variants peuvent être obtenus, par exemple, par le procédé décrit par COCO MARTIN et al. [J. Immunol.Methods. 145, p.1118, (1991)].

10 Les anticorps monoclonaux BF-19, B-R6 et B-N12 reconnaissent trois épitopes différents de l'IL-6R, et possèdent en outre les caractéristiques suivantes :

- l'anticorps monoclonal B-F19 entre en compétition avec l'IL-6 pour la liaison de l'IL-6R sur des  
15 lignées de cellules humaines, et inhibe la prolifération de lignées cellulaires IL-6 dépendantes. En outre, les Inventeurs ont montré que cet anticorps reconnaît des monocytes et des granulocytes.

- l'anticorps monoclonal B-R6 ne rentre en  
20 compétition que partiellement avec l'IL-6 pour le récepteur IL-6R, mais inhibe cependant la prolifération de lignées cellulaires humaines IL-6 dépendantes. Il est à cet égard 100 fois plus efficace que l'anticorps monoclonal B-F19.

25 - L'anticorps monoclonal B-N12 ne rentre pas en compétition avec l'IL-6 au niveau du récepteur IL-6R, et en outre, n'inhibe pas la prolifération de lignées cellulaires humaines IL-6 dépendantes.

Les anticorps monoclonaux conformes à  
30 l'Invention peuvent être utilisés pour le traitement de maladies dans lesquelles l'IL-6 est impliquée, telles que par exemple, le myélome multiple, la leucémie myéloïde, la maladie de Castleman, le lupus érythémateux systémique, les carcinomes rénaux, les arthropathies  
35 inflammatoires, etc...

Les anticorps monoclonaux conformes à

l'Invention peuvent être employés purs, ou bien couplés à des toxines, ou à des substances radioactives ou à tout autre agent thérapeutique. Ils peuvent également être encapsulés dans des liposomes.

5 Des préparations pharmaceutiques comprenant des anticorps monoclonaux B-F19, B-R6 et/ou B-N12 peuvent se présenter sous forme liquide ou sous forme lyophilisée. On peut utiliser pour stabiliser ces prépara-  
10 tions pharmaceutiques, des protéines, des sucres, des sucres-alcools, des acides aminés ; pour les tamponner, des sels inorganiques, de préférence du phosphate de sodium dans un sérum physiologique (PBS, pH 7,4) ; on peut également utiliser différents agents pour augmenter leur viscosité.

15 Les anticorps conformes à l' Invention sont utilisés à des concentrations comprises entre 0,5 et 5 mg/ml, de préférence 1 mg/ml lorsqu'ils sont utilisés dans un but thérapeutique. De manière générale, les préparations thérapeutiques contenant les anticorps  
20 conformes à l'Invention sont administrés de façon systémique, quoique l'administration locale ne soit pas exclue.

Les anticorps monoclonaux conformes à l'Invention peuvent être non seulement utilisés en thérapie,  
25 peutique, mais aussi dans un but prophylactique.

Les anticorps conformes à l'Invention peuvent être administrés isolément ; préférentiellement, ils seront administrés ensemble, ou combinés à d'autres anticorps monoclonaux afin de créer des complexes polymériques entre les différents anticorps monoclonaux et le  
30 récepteur IL-6R soluble. Ces complexes sont ensuite plus rapidement éliminés qu'un complexe monomérique comprenant un seul anticorps monoclonal et le récepteur de l'IL-6.

Les anticorps monoclonaux B-F19, B-R6 et B-N12  
35 peuvent également être utilisés comme réactifs de diagnostic pour identifier l'IL-6R, ou un épitope de

celui-ci, sur la surface des cellules ou dans des liquides biologiques. Pour de telles utilisations, les anticorps monoclonaux peuvent être couplés à des marqueurs, fluorescents, biotinylés, radioactifs ou  
5 autres. Il est également possible d'utiliser les anticorps monoclonaux conformes à l'Invention dans des tests ELISA ou RIA afin de doser le récepteur IL-6R dans des liquides biologiques. Les anticorps monoclonaux conformes à l'invention peuvent également être utilisés  
10 pour identifier et purifier le récepteur IL-6R, ou des épitopes dudit récepteur, à partir de préparations de macromolécules susceptibles de contenir ledit récepteur ou ses épitopes, tels que par exemple, des lysats et fractions cellulaires, des préparations peptidiques ou oligo-  
15 saccharidiques résultant par exemple de la digestion enzymatique d'une fraction cellulaire, ou bien obtenues par synthèse chimique.

Les anticorps monoclonaux conformes à l'Invention permettent également la production  
20 d'anticorps chimériques dont le domaine constant est d'origine humaine (immunoglobuline humaine), et la partie variable ou de préférence la partie hypervariable est d'origine murine (immunoglobuline murine). Pour le traitement des maladies dans lequel intervient l'IL-6,  
25 ces anticorps chimériques peuvent être utilisés ou bien purs, ou bien couplés à des toxines, des substances radioactives, d'autres substances médicamenteuses, ou bien encapsulés dans des liposomes.

La présente Invention sera mieux comprise à  
30 l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et d'utilisation des anticorps monoclonaux conformes à l'Invention.

Il va de soi, toutefois que ces exemples ne sont donnés qu'à titre d'illustration de l'objet de  
35 l'Invention, dont ils ne sauraient constituer en aucune manière une limitation.

# I. PREPARATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

## Exemple 1 - Immunisation, fusion, clonage et récolte des anticorps monoclonaux B-F19, B-R6 et B-N12

Un protocole d'immunisation dérivé de celui  
5 décrit par MATTHEW et SANDROCK [J. Immunol. Methods, 100, 73-82, (1987)].

Des souris femelles Balb/c ont été rendues tolérantes à l'égard de la lignée cellulaire utilisée pour la transfection avec l'IL-6R, de la façon suivante :  
10 les souris ont subi une injection intrapéritonéale de  $10 \times 10^6$  cellules CHO [T.T.PUCK, J.Exp.Med. 108, 945, (1958)], laquelle injection a été suivie 10 minutes, 24 heures et 48 heures plus tard par une nouvelle injection intrapéritonéale de 1 mg de cyclophosphamide en solution  
15 dans un tampon salin. Ce protocole a été répété à deux semaines d'intervalle 4 fois. Deux semaines après le dernier traitement, les souris ont subi une injection intrapéritonéale de  $10 \times 10^6$  cellules 46-20-5 (cellules CHO transfectées avec l'IL-6R). Ce protocole a été répété  
20 trois fois, à intervalle de deux semaines, après quoi la quatrième injection a été faite par voie intraveineuse, et les splénocytes ont été extraits quatre jours plus tard et fusionnés. La fusion a été effectuée de la façon suivante : les splénocytes ont été fusionnés avec des  
25 cellules murines de myélome dénommées X63Ag8653 (le rapport splénocytes/cellules de myélome est de 5:1), en présence de polyéthylène glycol [KEARNEY et al., J. of Immunol., 123, 1548, (1978)]. La lignée cellulaire X63Ag8653 est déposée à la COLLECTION EUROPEENNE DE  
30 CULTURES DE CELLULES ANIMALES (ECACC), PHLS Centre of Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wilshire, SP4 OJG, UK, sous le numéro de dépôt ECACC 850 114 20.

La suspension de cellules fusionnées a été  
35 lavée une fois, et cultivée sur milieu sélectif (RPMI 1640, 10% de sérum de cheval inactivé par la



chaleur, 4 mM de glutamine, 13,6 mg/l d'hypoxanthine, 0,17 mg/l d'aminoptérine, et 10 µg/ml d'insuline).

Dix jours après la fusion, les surnageants des cultures dans lesquelles une croissance d'hybridomes a été observée ont été testés pour détecter la production d'anticorps monoclonaux anti-IL-6R.

Dans ce but, 75 µl de surnageant de chaque culture d'hybridomes ont été testé par cytométrie de flux sur les lignées cellulaires CHO (IL-6R négative) et 46-20-5 (IL-6R positive). Les hybridomes produisant des anticorps reconnaissant la lignée 46-20-5 ont été retenus et ont été clonés quatre fois, en utilisant la méthode de la dilution limite (densité d'ensemencement 0,2 cellules par puits de culture). Les trois anticorps monoclonaux sélectionnés ont été testés sur différentes lignées cellulaires humaines, et ne réagissent qu'avec les lignées U266 [NILSSON et al., Clin. Exp.Immunol. 7 : 447. (1970)], RPMI8226 [MOORE et al., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 125, 1246-1250. (1967)], U937 [SUNDSTROM et NILSSON, Int.J.Cancer., 17, 567-577, (1976)], et KG1 [KOEFFLER et GOLDE, Science, 200, 1153-1154, (1978)], lesquelles sont toutes connues pour posséder un récepteur IL-6R. Des tests Elisa de type sandwich utilisant le récepteur IL-6R soluble et les différentes combinaisons possible de B-F19, B-R6 et B-N12 ont montré que ces trois anticorps monoclonaux reconnaissent effectivement ledit récepteur IL-6R. En outre, l'anticorps monoclonal B-F19 marque également les monocytes et les granulocytes ; la préincubation avec du sérum humain n'a aucune influence sur ce marquage, ce qui montre qu'il est indépendant du fragment FcR.

#### **Exemple 2 - Production in vivo et purification des anticorps monoclonaux B-F19, B-R6-et B-N12**

Les anticorps monoclonaux sont produits en grande quantité in vivo par injection intrapéritonéale des cellules d'hybridome B-F19, B-R6 et B-N12 dans des

souris Balb/c. Une semaine avant l'injection de cellules d'hybridome, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de 0,5 ml d'adjuvant de Freund incomplet. Le liquide d'ascite est récupéré 8 à 14 Jours après l'injection des cellules.

Les anticorps monoclonaux sont ensuite précipités à partir du liquide d'ascite par addition de sulfate d'ammonium (45 %), tamponnés à pH 7,7 par du Tris 0,02 mM et fixés à une colonne de Sépharose Q. Les anticorps fixés à la colonne sont lavés avec 1 % de Tween 20 dans 0,02 mM de Tris, pH 7,7 et ensuite élués de la colonne par une solution 0,02 mM Tris, 0,35 M NaCl, pH 7,7.

## II. - ACTIVITE BIOLOGIQUE DES ANTICORPS B-F19, B-R6 ET B-N12

### Exemple 3 - Inhibition de la prolifération, induite par l'IL-6, de la lignée cellulaire humaine IL-6 dépendante XG1, par les anticorps B-F19, B-R6 et B-N12.

La lignée cellulaire humaine XG1 est une lignée de myélome, dont la prolifération et les propriétés dépendent de IL-6, et qui a été décrite par KLEIN [BLOOD, 74, 749, (1989)]. La lignée XG1 est cultivée dans du milieu RPMI1640 en présence de 10 % de sérum de veau foetal et de beta mercaptoéthanol, en présence de 10 pg (= 1 unité) d'IL-6 par puits de culture pendant trois jours. Des cultures sont effectuées en présence de différentes concentrations des anticorps B-F19, B-R6 et B-N12. Les cellules sont ensuite cultivées pendant 16 heures en présence de thymidine  $H^3$  qui s'incorpore dans l'ADN néosynthétisé, ce qui permet l'évaluation de la croissance cellulaire, puis elles sont collectées, et la radioactivité est mesurée dans un compteur bêta. Les mesures sont faites en parallèle, sur des cellules cultivées en présence de différentes concentration des anticorps B-F19, B-R6 et B-N12, sur des cellules cultivées sans anticorps en présence d'IL-6, et sur des

cellules cultivées en l'absence d'IL-6. La radioactivité moyenne mesurée sur les cellules XG1 cultivées en l'absence d'IL-6 est de 6000 cpm. Les résultats obtenus en l'absence d'anticorps et en présence de concentrations croissantes des anticorps B-F19, B-R6 et B-N12 sont indiqués dans le tableau I ci-dessous :

TABLEAU I  
RADIOACTIVITE (CPM)

		B-F19	B-R6	B-N12
10	0	44800	43500	48200
	1 pg	38300	43300	39200
	10 pg	39900	41000	42300
	100 pg	40500	36400	40700
	1 ng	38900	26400	40700
15	10 ng	36200	8700	38700
	100 ng	25000	2900	42400
	1 µg	10600	1900	38900
	10 µg	4800	1200	37900

Ces résultats montrent clairement que la croissance cellulaire est plus faible dans le cas des cellules cultivées en présence des anticorps monoclonaux B-F19, et B-R6 que dans celui des cellules témoins cultivées en présence d'IL-6 sans anticorps. Ces deux anticorps inhibent donc la croissance IL-6 dépendante de la lignée cellulaire XG1. En revanche l'anticorps B-N12 est sans effet sur la croissance de la lignée cellulaire XG1 en présence d'IL-6.

**Exemple 4 - Etude de la compétition entre B-F19, B-R6, B-N12 et IL-6 pour le récepteur de l'IL-6R.**

Des cellules U266 sont préincubées pendant 15 minutes en présence de 100 ng d'IL-6, après quoi l'anticorps monoclonal à tester est ajouté. Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont lavés 2 fois, et incubées avec du sérum de chèvre anti-souris marqué à la fluorescéine pendant 30 minutes, lavées à nouveau et

analysées par cytométrie de flux.

Le Tableau II ci-dessous représente le pourcentage de cellules marquées par chacun des différents anticorps monoclonaux, utilisés à des concentrations décroissantes. Les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent au pourcentage de cellules marquées par l'anticorps monoclonal à même concentration, sans préincubation en présence d'IL-6.

TABLEAU II

		B-F19	B-R6	B-N12
10	1 µg	(73) 59	(71) 69	(70) 73
	500 ng	(66) 64	(74) 71	(68) 71
	200 ng	(76) 59	(80) 81	(74) 84
	100 ng	(63) 40	(73) 69	(71) 58
15	40 ng	(76) 31	(76) 57	(70) 76
	20 ng	(79) 10	(79) 68	(60) 71
	10 ng		(63) 63	(59) 66
	5 ng		(42) 47	(33) 55
	2,5 ng		(28) 29	(15) 27
20	1 ng		(10) 8	( 5) 8

On observe que la fixation des anticorps monoclonaux B-R6 et B-N12 au récepteur IL-6R n'est pas inhibée par la présence de IL-6. Ceci indique que B-R6 et B-N12 se fixent au récepteur IL-6R de manière indépendante de l'IL-6. En revanche, l'anticorps B-F19 rentre en compétition avec IL-6 au niveau du récepteur IL-6R, et la fixation de l'anticorps B-F19 au récepteur IL-6R est diminuée à toutes les concentrations, par la présence d'IL-6.

Dans une autre expérience, les cellules U266 sont incubées en présence de trois concentrations différentes des anticorps monoclonaux B-F19, B-R6 et B-N12, pendant 30 minutes, puis en présence de 15 ng d'IL-6 biotinylée pendant 30 minutes, après quoi les cellules sont marquées avec de la streptavidine

phycoérythrine (PE) et comptées par cytométrie de flux.

En présence d'IL-6 biotinylée et en l'absence d'anticorps monoclonaux, 48 % des cellules U266 sont marquées par l'IL-6 ; ce pourcentage est réduit à 10% quand les cellules sont en outre incubées en présence de 25 ng d'IL-6 non marqué ; à 7 % si la préincubation a lieu en présence de 50 ng d'IL-6 non marquée et à 4% pour une préincubation en présence de 100 ng d'IL-6 non marquée.

Le Tableau III ci-dessous indique le pourcentage de cellules marquées par l'IL-6 biotinylée en présence de quantités croissantes des anticorps monoclonaux conformes à l'Invention.

TABLEAU III

Concentration mAb	B-F19	B-R6	B-N12
50 ng	5%	13%	55%
100 ng	8%	21%	55%
500 ng	3%	15%	57%

La fixation de l'IL-6 est complètement bloquée à toutes les concentrations testées, par l'anticorps B-F19. En présence de l'anticorps B-N12 en revanche, aucune inhibition de la fixation de l'IL-6 n'est observée, alors que l'anticorps B-R6 provoque seulement une inhibition partielle, indépendante de la dose d'anticorps utilisée.

Dans une autre série d'expériences, les cellules U266 ont été préincubées avec les anticorps B-F19, B-R6 à différentes concentrations pendant 15 minutes, après quoi les cellules ont été incubées avec 100 ng d'IL-6 biotinylée. Après lavage, les cellules ont été marquées pour la cytométrie de flux par incubation avec l'avidine PE.

En l'absence d'anticorps, le pourcentage de cellules marquées par 100 ng d'IL-6 biotinylée est de

55 %. Le pourcentage de cellules marquées, en présence de 100 ng d'IL-6 biotinylée, et après une préincubation avec les anticorps B-F19 ou B-R6 est indiqué dans le Tableau IV ci-dessous.

5

TABLEAU IV

	Anticorps	B-F19	B-R6
	2,5 ng	52 %	51 %
	5 ng	45 %	41 %
	10 ng	29 %	27 %
10	20 ng	16 %	22 %
	40 ng	10 %	19 %
	80 ng	7 %	20 %
	150 ng	5 %	19 %
	300 ng	4 %	17 %
15	600 ng	4 %	16 %
	1,25 µg	3 %	16 %
	2,5 µg	3 %	18 %

Ces résultats montrent qu'il existe une compétition entre B-F19 et IL-6 pour le récepteur IL-6R, avec une absence de liaison de l'IL-6 biotinylée en présence de concentrations de l'anticorps supérieures à 80 ng alors que, dans le cas de l'anticorps B-R6, celui-ci n'est pas capable de bloquer complètement la liaison de l'IL-6 à son récepteur (33% de la liaison maximale) même à une concentration de 2,5 µg.

Il ressort clairement de ces trois expériences, que en ce qui concerne la fixation au récepteur IL-6R, il n'existe qu'une interaction marginale entre IL-6 et l'anticorps monoclonal B-R6, alors qu'au contraire l'anticorps monoclonal B-F19 rentre en compétition avec l'IL-6 pour le récepteur IL-6R, et inhibe par ce mécanisme la prolifération IL-6 dépendante de la lignée cellulaire XG1. Pour ces raisons, on suppose que le mécanisme d'inhibition de B-R6 est différent de celui de B-F19, et ce d'autant plus que l'activité inhibitrice

de B-R6 est 100 fois supérieure à celle de B-F19.

**Exemple 5 - Etude de reconnaissance d'épitope entre les anticorps monoclonaux B-F19, B-R6 et B-N12**

Pour cette expérience, les cellules U266 ont  
5 été incubées pendant 30 minutes avec les anticorps  
biotinylés à une concentration de 250 ng par puits de  
culture et les anticorps non marqués à des concentrations  
de 1 µg, 500 ng, 250 ng, et 125 ng suivant différentes  
combinations. Après deux lavages, les cellules sont  
10 préparées pour des analyses de cytométrie de flux après  
incubation avec de la strepavidine PE.

Les résultats, exprimés en pourcentage de  
cellules marquées, sont indiqués dans le Tableau V  
suivant.

15

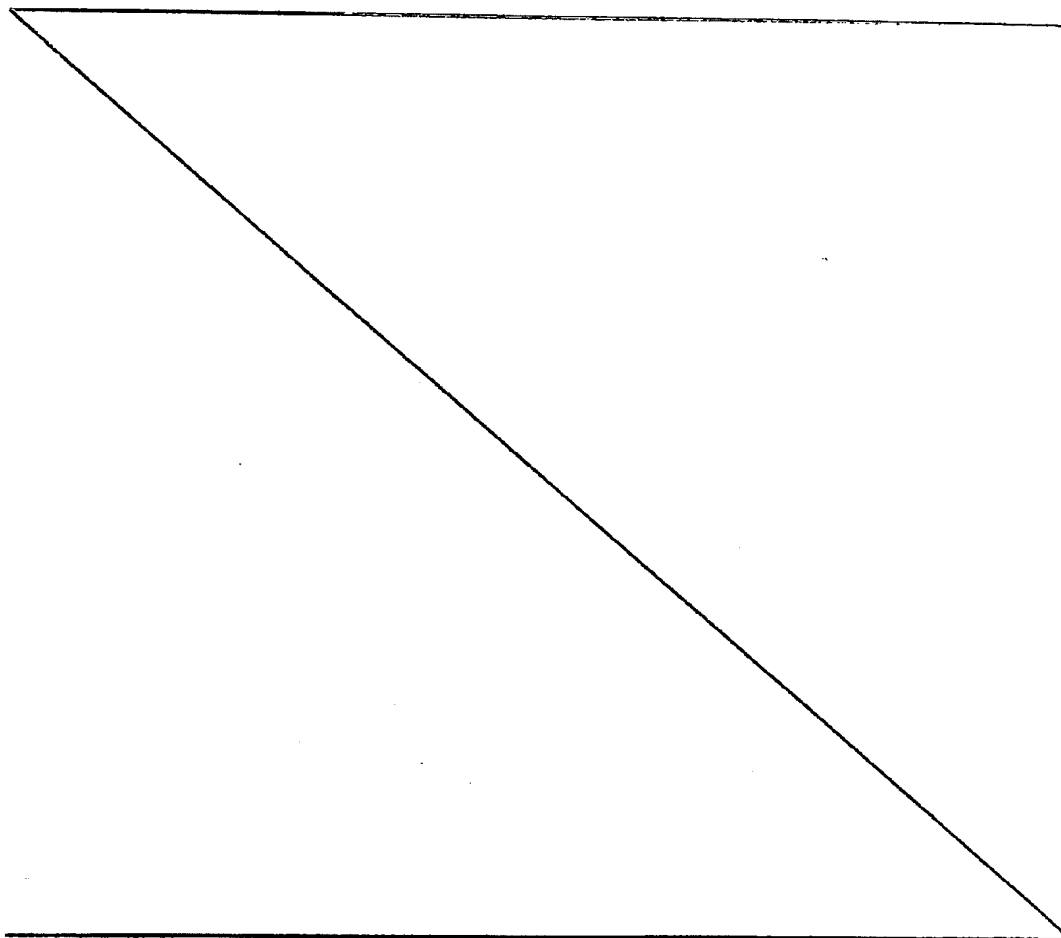


TABLEAU V

5	mAb marqué		B-F19	B-R6	B-N12
	mAb non marqué				
	aucun		61	42	73
10	B-F19	1 µg	3	40	85
		500 ng		41	80
		250 ng		36	90
		125 ng		48	94
15	B-R6	1 µg	57	5	91
		500 ng	38		73
		250 ng	43		87
		125 ng	68		88
20	B-N12	1 µg	54	39	8
		500 ng	68	37	
		250 ng	60	43	
		125 ng	65	38	

Ces résultats montrent qu'aucun des anticorps considérés n'entre en compétition avec un autre anticorps que lui-même, et donc qu'ils reconnaissent des épitopes différents.

**Exemple 6 - Analyse de Scatchard de la liaison des anticorps monoclonaux B-R6 ET B-N12 avec IL-6R**

Pour chaque expérimentation, 40 µg d'anticorps monoclonal est incubé en présence d'iodure de sodium marqué à l'iode 125 (0,5 mCi) dans 180 ml de tampon PBS. Ensuite 10 µg de chloramine T (0,4 mg/ml) sont ajoutés, et la réaction est stoppée au bout d'une minute par addition de 10 µl de bisulfite de sodium (0,5 µg/ml). Les anticorps monoclonaux marqués de la sorte sont séparés par chromatographie sur une colonne de Sephadex G-25 de l'iode libre.  $2,5 \times 10^6$  cellules par puits, de la lignée



46-20-5, ou U266 sont incubées avec différentes concentrations d'anticorps B-R6 ou B-N12 marqués à l'iode 125, et d'un excès (500 fois) d'anticorps B-R6 et B-N12 non marqués. L'incubation est effectuée pendant 120 minutes à 4 °C dans un volume total de 1 ml de tampon PBS à 1% d'albumine. Après trois lavages, la radioactivité est mesurée dans un compteur gamma. Les mesures effectuées permettent le calcul des constantes spécifiques de la réaction de liaison :

- liaison maximale : Bmax,
- rapport ligand libre sur ligand lié : B/F,
- constante de dissociation : Kd,
- nombre de sites de fixation/cellule : n.

Ces constantes sont indiquées pour chaque anticorps et chaque lignée cellulaire dans le Tableau VI ci-dessous :

TABLEAU VI

		<u>46-20-5</u>	<u>U266</u>
20	B-R6		
	Bmax (cpm)	29200	31500
	B/F	0,0396	0,032
	Bmax (M)	$23,9 \times 10^{-12}$	$25,7 \times 10^{-12}$
	Kd (M)	$0,6 \times 10^{-9}$	$0,8 \times 10^{-9}$
	n	9540	6160
25	B-N12		
	Bmax (cpm)	38000	34000
	B/F	0,0282	0,02
	Bmax (M)	$30,6 \times 10^{-12}$	$27,3 \times 10^{-12}$
	Kd (M)	$1,08 \times 10^{-9}$	$1,36 \times 10^{-9}$
	n	12200	6550

**Exemple 7- Mesure de l'IL-6R soluble par ELISA sandwich**

Le protocole opératoire est le suivant :

- Incubation des plaques de microtitration avec l'anticorps B-N12 (0,5 µg/puits dans 100 µl de tampon PBS) pendant une nuit à 4 °C.
- Saturation avec du tampon PBS à 5 %

d'albumine pendant 90 minutes à température de la pièce.

- Distribution dans les puits de la plaque de microtitration de quantités variables de surnageant de culture de la lignée cellulaire 46-20-5, contenant le  
5 récepteur IL-6R sous forme soluble, et ajustement à 100  $\mu$ l par du tampon PBS ; incubation pendant 2 heures à 37 °C ;

- Distribution d'anticorps B-R6 biotinylé dans les puits de la plaque de microtitration (0,5  $\mu$ g dans  
10 100  $\mu$ l de tampon par puits, en présence de Tween 0,005%), incubation pendant 2 heures à température de la pièce ;

- Distribution dans les puits d'une solution de streptavidine marquée à la peroxydase, puis de son substrat (dihydrochlorure de O-phénylène diamine) et  
15 mesure de la densité optique à 405 nm.

Les résultats sont reportés dans le Tableau VII suivant :

TABLEAU VII

SURNAGEANTS 46-20-5	DO <sub>405</sub>
20 100 $\mu$ l	1,537
50 $\mu$ l	1,247
25 $\mu$ l	1,073
12 $\mu$ l	0,819
6 $\mu$ l	0,558
25 3 $\mu$ l	0,396
Bruit de fond	0,099

Ces résultats montrent que même sur 3  $\mu$ l de surnageant, la présence du récepteur IL-6R peut être aisément détectée.

## REVENDEICATIONS

- 1) Anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur IL-6R, caractérisé en ce qu'il reconnaît un épitope choisi dans le groupe constitué par:
- 5                   - l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal d'isotype IgG1 dénommé B-F19, produit par la lignée d'hybridome déposée le 12 août 1992 auprès de la C.N.C.M., sous le numéro de Dépôt I1256 ;
- l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal
- 10 d'isotype IgG1 dénommé B-R6, produit par la lignée d'hybridome déposée le 12 août 1992 auprès de la C.N.C.M., sous le numéro de Dépôt I-1255 ;
- l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal d'isotype IgG1 dénommé B-N12, produit par la lignée
- 15 d'hybridome déposée le 12 août 1992 auprès de la C.N.C.M., sous le numéro de Dépôt I-1257.
- 2) Utilisation d'un anticorps selon la revendication 1, pour l'obtention de médicaments.
- 3) Utilisation selon la revendication 2,
- 20 caractérisée en ce que lesdits médicaments sont destinés au traitement ou à la prophylaxie de maladies impliquant l'IL-6.
- 4) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que lesdits médicaments sont destinés
- 25 au traitement ou à la prophylaxie du myélome multiple, de la leucémie myéloïde, de la maladie de Castleman, du lupus érythémateux systémique, des carcinomes rénaux, et des arthropathies inflammatoires, et des autres maladies IL-6 dépendantes.
- 30 5) Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent, en tant que principe actif, au moins un anticorps selon la revendication 1.
- 6) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 5, caractérisées en ce que ledit anticorps
- 35 est présent à une concentration comprise entre 0,5 et 5 mg/ml, de préférence 1 mg/ml.

7) Utilisation d'un anticorps selon la revendication 1, pour la détection du récepteur IL-6R, ou d'un épitope de celui-ci.

8) Utilisation d'un anticorps selon la revendication 1, pour le dosage du récepteur IL-6R soluble.

9) Réactifs de diagnostic, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un anticorps selon la revendication 1.

10) Hybridome, caractérisé en ce qu'il appartient à l'une des lignées suivantes:

- lignée productrice de l'anticorps B-F19, déposée le 12 août 1992 auprès de la C.N.C.M., sous le numéro de Dépôt I1256 ;

15 - lignée productrice de l'anticorps B-R6, déposée le 12 août 1992 auprès de la C.N.C.M., sous le numéro de Dépôt I-1255.

- lignée productrice de l'anticorps B-N12, déposée le 12 août 1992 auprès de la C.N.C.M., sous le numéro de Dépôt I-1257.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9210005  
FA 475022

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DATABASE WPIL Section Ch, Week 9027, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 90-206693 & JP-A-2 138 993 (AJINOMOTO) 28 Mai 1990 * abrégé *	1-10
X	EP-A-0 409 607 (T. KISHIMOTO) * revendications *	1-10
X	EP-A-0 413 908 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT LTD.) * tableau 1 *	1,7-10
X	COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY vol. 54, 1989, COLD SPRING HARBOR NY, US pages 713 - 722 T. TAGA ET AL. 'Interleukin-6 receptor and a unique mechanism of its signal transduction.' * page 715, colonne de droite, ligne 29 - ligne 58 *	1,7-10
X	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 143, no. 9, 1 Novembre 1989, BALTIMORE MD, US pages 2900 - 2906 Y. HIRATA ET AL. 'Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies.' * abrégé *	1,7-10
A	DE-A-3 939 706 (CENTRE RÉGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE) * revendications *	1-10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12P A61K G01N C12N C07K
Date d'achèvement de la recherche 19 AVRIL 1993		Examineur NOOIJ F.J.M.
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		